

<学会記録>Chemically defined mediumによるStr. mutans AL 7-1 株の溶菌酵素産生とその2,3の性状について(東日本学園大学歯学会第2回学術大会)

著者名(日)	鎌口 有秀, 馬場 久衛, 金森 啓子, 田中 かえで, 野崎 善弘, 小松 始, 秋貞 泰輔
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	3
号	1
ページ	109-110
発行年	1984-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00007107/

実験動物は Wistar-Kyoto 系ラット (京都大学医学部動物センター) を由来とし、東日本学園大学動物施設で選択交配を20代以上続け、現在繁殖継代中の Plaque-Susceptible (SUS) ラット及び Plaque-Resistant (RES) ラットを用いた。SUS および RES ラットの歯肉上皮細胞への付着細菌数が炎症の進行にともない、どのように変化するかを剥離歯肉上皮細胞のギムザ染色標本を作成し、調べた。さらに走査電子顕微鏡による歯肉局所の細菌の付着状態を観察した。

ギムザ染色標本を用いて各時期における細胞1個あたりの付着細菌数を調べたところ、5週齢時では SUS と RES ラットの間で付着菌数にほとんど差はなく、その後 SUS ラットでは多数の細菌の歯肉上皮細胞への付着像が認められた。一方、RES ラットではいずれの時期においても SUS ラットに比べて付着細菌数は少数だった。

走査電子顕微鏡を用いた観察では、SUS ラットの歯肉上皮への付着細菌数はいずれの時期においても RES ラットに比べて多かった。SUS ラットは、市販粉末飼料投与後3ヶ月以内で急性歯肉炎をおこし、3ヶ月以降12ヶ月目で亜急性から慢性炎症をおこすが、炎症の変化にともない、球菌、多種類の桿菌およびスピロヘータなどが認められ、歯肉内への侵入像も観察された。

以上の成績から細菌の付着が本病の発症、進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、さらに付着のメカニズムについて検討する予定である。

質 問 加藤 熙 (保存・I)

歯肉の観察部位は、歯肉ポケットの底部か辺縁部ですか。ポケットの底部とすれば、どのように走査型電顕で

観察されましたか。

回 答 磯貝 浩 (口腔解剖 I)

ポケット底部という意味について、SUS ラットのポケット形成は、2段階あり、1次、2次の2種のポケットが形成される。今回の SEM の所見は、1次ポケットの底部を観察して得たものである。

質 問 奥山富三 (口腔病理)

歯肉上皮内に細菌体が侵入する時期と炎症の強さとの関係はどのようなものですか。

回 答 磯貝恵美子 (口腔衛生)

12ヶ月目のもので認められている。

質 問 加藤 熙 (保存・I)

歯肉組織への、菌の侵入は、上皮細胞のどのような所から入っていましたか。お教え下さい。

回 答 磯貝恵美子 (口腔衛生)

SEM の観察のみではわからない。さらに TEM や歯肉組織内における細菌を蛍光抗体法等で証明したいと考えている。

質 問 馬場久衛 (口腔細菌)

実験群の歯肉に段差があり、ここに歯垢が沈積すると、それに接触している歯肉組織はその影響を受けると考えられます。したがって、実験群と対照群の細菌の付着の差はこれに原因することも考えられる。実験群と対照群で本質的に歯肉細胞に細菌の付着という点で差があるのですか。

回 答 磯貝恵美子 (口腔衛生)

この問題については現在 *in vitro* の付着アッセイ系を用いて検討中である。

10. Chemically defined medium による *Str. mutans* AL 7-1 株の溶菌酵素産生とその2,3の性状について

鎌口有秀, 馬場久衛, 金森啓子,
田中かえで, 野崎善弘, 小松 始,
秋貞泰輔 (口腔細菌)

(目的) 演者らは *Streptococcus* (以下 S.) *sanguis* を溶解するヒト歯垢由来 *S. mutans* AL 7-1 株の産生する溶菌酵素 (以下 LE) の諸性状を明らかにするためその精製を試みてきた。しかし、従来から用いてきた市販培地 (以下 THY) ではその複雑な培地成分のため純化が極めて困難であった。そこで、THY に含まれる複雑な培地成分の混入を避けるため、簡単な種々の既知成分よりなる Partially defined medium (以下 PD) と Chemically defined medium (以下 CD) を調製して、

LE 産生性を検討し THY より LE 産生が良好であることを先の当学会において報告した。今回はこの CD を用いたときの LE 産生をさらに高めるための条件を検討した。

(方法) CD 中で菌の増殖と産生された酵素の安定性に関係すると考えられるグルコース濃度、リン酸 buffer 濃度および培地の initial pH の3因子を L_9 の直交配列に組み、欄外に培養時間を取り、これら4因子の LE 産生における最適条件を検討した。

(結果) CD中のこれら4因子のLE産生に及ぼす影響を検定した結果、培養時間が5%の危険率で、グルコース濃度、リン酸 buffer 濃度および initial pHは1%の危険率でいずれも有意となった。また、各因子はグルコース濃度0.5%, リン酸 buffer 濃度0.08M, initial pH 7.0, 培養時間6時間のときが最もLE産生が高いことがわかった。そこで、この組成のCDで大量培養を行い分子量1万のフィルターで限外ろ過後、その上部を、Sephadex G-75にかけ elution patternをみたところ、THYを用いた場合には活性画分に培地成分が混入するのに対し、本CDの場合活性画分に培地成分が混入せず、さらに低分子の培地成分をほぼ完全に分離することができた。

両者の活性画分の比活性をみたところ、本CDを用いた方がTHYより約10倍高い値を示した。また、Sephadex G-75の活性画分は培養上清より約170倍活性が上昇し

た。

質 問

磯貝恵美子(口腔衛生)

①溶菌活性の assay 法はどのようにしたのか。

②精製過程での回収率はどの位か。

③溶菌活性の assay 時に用いた bacteria はどのような種類なのか。

グラム陰性菌も用いたか。

回 答

鎌口有秀(口腔細菌)

①溶菌酵素測定法は基質として *S. mutans* E49 死菌の whole cell を使用し、加熱失活させた酵素系との OD_{540nm} の差を測定した。

②CD-2 培地を用いた場合、比活性は約170倍増加した。また、Sephadex G-75 FI の収量は約0.1%である。

③グラム陰性菌に対する溶菌作用は検討していない。

11. 1歳児の間食摂取と齲蝕罹患との関係に関する経年的研究

畑 良明, 岡田泰紀 (保存・Ⅱ)

乳幼児に発症する齲蝕は、一般に保護者である母親の育児に左右され、乳幼児の生活習慣、特に食生活、食習慣が強くかかわっている。したがって、保護者は乳幼児に対して、正しい生活習慣、齲の確立を行わなければならない。

このような理由から、本研究では1歳児が3歳になるまで診査および調査し得た経年的資料をもとにして、食生活、食習慣の実態とその推移ならびに齲蝕との関係について検討を加えた。

調査対象は、横須賀市北部保健所で毎年施行している1歳、2歳および3歳児歯科検診受診者のうち、経年的に受診したもののみを対象に、ある限られた、あるいは選ばれた集団に落入の危険性を極力さけ、その結果次のような結論を得た。

1. 齲蝕有病状況は、df 者率が1才で6.5%, 2才48.7%, 3才82.5%へと増加し、dft index, df 歯率も増齢とともに増加していた。

2. 人工栄養児は、母乳栄養児よりも dft が低く、また自律哺乳群は、規律哺乳群より高い傾向を示した。

3. 生後4ヶ月以後に哺乳ピンを使用した群は、4ヶ月以前に使用した群より dft が有意に高く、また就寝時哺乳ピンを使用するものの dft が増齢とともに有意に高くなっていた。

4. 早期より飲料類を摂取した群の dft が高い傾向に

あり、菓子類自律摂取群も同様に齢とともに dft が高くなっていた。

5. 飲料類のうち、サイダー、コーラ類の摂取率が、また菓子類のうちチョコレート、ガム、アメ類の摂取率が増加し、さらにこれら食品の常摂取者の dft は他のものより高かった。

6. 飲料類、菓子類摂取頻度の増加に従い、dft が有意に増加した。

7. 本調査対象としての乳幼児の食生活、食習慣の変遷と推移が明らかになり、間食摂取頻度は1日2回以内が望ましいなど、指導上の要綱を再認識することができた。

質 問

井藤信義(口腔衛生)

①調査年度は。

②自律間食群と規律間食群の分類した方法は。

③フッ化物塗布経験と今回の結果に加味して考慮されましたか。

回 答

畑 良明(保存・Ⅱ)

①昭和52年から昭和54年の3年間であり、3年間経年的に受診したもののみを対象とした。

②1年ごとのアンケート調査において、母親に問診を行い、自律的に乳幼児が間食を摂取している場合を自律摂取群とし、他を規律摂取群に、母親の主観によって分類した。

③横須賀市北部保健所ではフッ素塗布を行わなかった